

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE



Technique du ganglion sentinelle en pathologie tumorale ORL:

Intérêt par rapport au curage traditionnel, corrélation des
résultats avec certains marqueurs tissulaires (EGFR,
angiogénèse, statut HPV), à partir d'une population de 50
patients

MEMOIRE PRESENTE PAR

M. Amal BENLEMLIH

Né le 05/07/1981 à Fès

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE SPECIALITE EN MEDECINE

Option : Anatomie pathologique

Sous la direction de : Pr. Valérie Costes et
Pr. Afaf AMARTI

Juin / 2012

Table des matières

| | |
|--|----|
| Table des matières | 1 |
| I- INTRODUCTION | 3 |
| I.1. Problématique | 3 |
| I.2. Annonce du plan | 4 |
| II- Première partie: étude du (ou des) ganglion (s) sentinelle (s) | 5 |
| II-1 Matériels et méthodes..... | 5 |
| a. Repérage des ganglions sentinelles..... | 5 |
| b. Classification TNM clinique (cTNM) | 5 |
| c. Recul et suivi | 7 |
| d- technique d'analyse du ganglion sentinelle | 7 |
| e. Classification histopathologique des métastases..... | 8 |
| II-2- Résultats..... | 11 |
| a.Repérage spatial des ganglions sentinelles:..... | 11 |
| b. Analyse standard sur les évidements cervicaux..... | 12 |
| c. Analyse en immunohistochimie sur coupes semisériées SS-IHC..... | 12 |
| d. Taille des métastases :..... | 14 |
| e- Upstaging ganglionnaire:..... | 14 |
| II-3- DISCUSSION | 15 |
| a. L'analyse du ganglion sentinelle avec immunohistochimie sur coupes sériées est une technique sensible | 15 |
| b. L'analyse du ganglion sentinelle avec immunohistochimie sur coupes sériées permet un meilleur staging des patients..... | 16 |
| c. Perspectives d'analyse extemporanée?..... | 17 |
| III- Deuxième partie: Recherche de facteurs histologiques prédictifs de micrométastases | 18 |
| III-1- MATERIELS ET METHODE..... | 18 |
| a.Evaluation des paramètres histologiques | 18 |
| b. Technique de l'étude immunohistochimique: | 18 |
| c. Evaluation des résultats immunohistochimiques | 19 |
| III-2- RESULTATS | 20 |
| a- Aspects clinico-pathologiques : | 20 |
| b- Etude immunohistochimiques: | 22 |

| | |
|-------------------------|----|
| III-3- DISCUSSION | 28 |
| IV- CORRELATION | 31 |
| V- CONCLUSION..... | 34 |
| VI- RESUME:..... | 35 |
| Références | 37 |

I- INTRODUCTION

I.1. Problématique

La médecine s'oriente de plus en plus vers les techniques dites « minimal invasive ». La chirurgie cervico-faciale ne déroge pas à cette règle. En oncologie néanmoins, l'objectif thérapeutique repose en premier sur le contrôle carcinologique.

Ainsi, il apparaît une dichotomie entre d'une part la volonté de réduire les séquelles post-opératoires et d'autre part la nécessité de garantir une prise en charge optimale aux patients.

La prise en charge des cous cNO en carcinologie ORL est un challenge. Jusqu'à présent, l'évidement cervical fonctionnel est le garant d'un diagnostic exhaustif ainsi que d'une prise en charge thérapeutique optimale [1-2]. Néanmoins, environ 3% de ces patients risquent de présenter une récurrence cervicale [3].

L'examen anatomo-pathologique est parfois mis en défaut par manque de sensibilité pour diagnostiquer certaines métastases ganglionnaires. Par ailleurs, l'évidement cervical fonctionnel complet est pourvoyeur d'une morbidité non négligeable, quand elle est recherchée [4].

Sur le modèle du ganglion sentinelle en carcinologie mammaire [3], l'idée d'adapter cette technique en ORL est apparue dès les années 2000. Le but était double, avant tout augmenter la sensibilité diagnostique en Anatomie pathologique en réduisant le volume de matériel à analyser, puis limiter la survenue de séquelles chirurgicales.

Au cours des dernières décennies, un accent particulier a été mis sur l'enquête des marqueurs valides prédictifs de la survenue des carcinomes épidermoïdes, des métastases ganglionnaires dans la région tête et cou et pouvant être des agents pour une thérapeutique ciblée.

Enfin, le quart des patients présentant un carcinome épidermoïde de la tête et du cou de stade I et II s'affrontent à l'échec thérapeutique, indiquant qu'un traitement plus agressif est justifié pour ce groupe ce qui rend nécessaire la détermination de critères histologiques et immunohistochimiques de mauvais pronostic.

I.2. Annonce du plan

Notre travail a porté sur une étude rétrospective de 50 patients colligés au sein du service d'anatomie pathologique du CHU de Montpellier entre 2002 et 2008.

Tous les patients présentaient un carcinome épidermoïde de la cavité orale ou de l'oropharynx cliniquement cNOMO, à la prise en charge et n'avaient jamais reçu de traitement carcinologique antérieur. Il s'agissait systématiquement de lésions classées cT1-T2 et ayant fait l'objet d'une injection péri-tumorale de traceur isotopique pour détecter les ganglions sentinelles. Ces patients ont bénéficié d'un curage classique dans lequel le ou les ganglion(s) sentinelle(s) ont été repérés et traités selon la technique recommandée.

Le but de ce travail est double. Nous allons comparer les résultats de l'histologie standard après simple coloration à l'hématéine éosine des ganglions sentinelles repérés après scintigraphie aux résultats obtenus après immunohistochimie avec un anticorps anti pan-cytokératine, réalisée sur coupes sériées tous les 200 microns jusqu'à épuisement du bloc.

Secondairement nous allons identifier certains paramètres histologiques permettant de soulever dans ces tumeurs de faible stade, un sous type de haut risque de progression tumorale pouvant bénéficier d'une stratégie thérapeutique plus adaptée. Par ailleurs, nous allons évaluer par étude immunohistochimique des facteurs intervenant dans la prolifération et l'invasion tumorale à savoir l'expression de l'EGFR, du VEGF (vascular endothelial growth factor), et de D2-40/ki67 (pour évaluer la prolifération lymphatique). Nous établirons également le statut HPV de ces tumeurs (P16 et hybridation avec les sondes HPV16/18).

Nous chercherons d'éventuelles corrélations entre ces différents marqueurs tissulaires et la présence de métastases ganglionnaires.

II- Première partie: étude du (ou des) ganglion (s) sentinelle (s)

II-1 Matériels et méthodes

Entre 2002 et 2008, 53 patients successifs ont été inclus dans le service. Cependant, seuls 50 patients ont été finalement traités selon le protocole prévu. Tous présentaient une lésion cliniquement cNOMO, à la prise en charge et n'avaient jamais reçu de traitement carcinologique antérieur. Il s'agissait systématiquement de lésions classées cT1-T2.

La répartition de 34 hommes pour 16 femmes est habituelle. L'âge médian au moment de la prise en charge était 55,3 ans (29-87).

30 patients présentant une lésion latéralisée ont bénéficié d'un évidement homolatéral, les 20 autres ont été traités par évidement fonctionnel bilatéral. Au total, 76 curages furent pratiqués.

a. Repérage des ganglions sentinelles

Une scintigraphie cervicale a été réalisée chez chaque patient en vue de repérer les ganglions sentinelles, et tout particulièrement ceux correspondant à un drainage inhabituel. Toutes les injections ont été réalisées par le même opérateur, le matin même de l'intervention. Après anesthésie locale, une dose de 0,9 mCi de Nanocis a été administrée en sous cutané à trois points d'injection péri-tumoraux. Après un délai d'environ 45 minutes, un repérage par lymphoscintigraphie permettait au médecin nucléaire de réaliser un marquage cutané en regard du (des) ganglion(s) sentinelle(s).

Cet examen était systématiquement doublé par un repérage per-opératoire de la « zone chaude », à l'aide d'une sonde gamma portable. Afin de diminuer le bruit de fond, la résection de la lésion primitive a été effectuée, le plus souvent, en premier temps opératoire. Le balayage de chaque ganglion sentinelle excisé a permis de confirmer *ex vivo* sa radioactivité.

b. Classification TNM clinique (cTNM)

A la prise en charge, tous les patients étaient considérés cT1-T2 NOMO. Selon les recommandations de la Société Française d'ORL, le bilan initial comportait une imagerie conventionnelle par TDM cervico-thoracique injectée, un bilan endoscopique des VADS sous anesthésie générale. A l'issue de celui-ci, et en

l'absence de critère de non-inclusion, une prise en charge chirurgicale première a été pratiquée.

Classification TNM pathologique 2009 (pTNM)

TNM classification of carcinomas of the oral cavity and oropharynx

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|------------|------------|----|----|---------|----|----|----|----------|----|----|----|-----------|--------|----|----|--|----|--------|----|-----------|------------|----|----|--|-----|------------|----|-----------|-------|----|----|--|-----|-------|----|-----------|-------|-------|----|---|---------|-----|----|----|---------|----|----|----|----------|----|----|----|-----------|--------|----|----|--|----|--------|----|-----------|------------|----|----|--|-----|------------|----|-----------|-----|-------|----|-----------|-------|----|----|--|-------|-------|----|
| <p>TNM classification of carcinomas of the lip and oral cavity^{1,2}</p> <p>T – Primary tumour TX Primary tumour cannot be assessed T0 No evidence of primary tumour Tis Carcinoma in situ T1 Tumour 2 cm or less in greatest dimension T2 Tumour more than 2 cm but not more than 4 cm in greatest dimension T3 Tumour more than 4 cm in greatest dimension T4a (lip) Tumour invades through cortical bone, inferior alveolar nerve, floor of mouth, or skin (chin or nose) T4a (oral cavity) Tumour invades through cortical bone, into deep/extrinsic muscle of tongue (genioglossus, hyoglossus, palatoglossus, and styloglossus), maxillary sinus, or skin of face T4b (lip and oral cavity) Tumour invades masticator space, pterygoid plates, or skull base; or encases internal carotid artery Note: Superficial erosion alone of bone/tooth socket by gingival primary is not sufficient to classify a tumour as T4.</p> <p>N – Regional lymph nodes## NX Regional lymph nodes cannot be assessed N0 No regional lymph node metastasis N1 Metastasis in a single ipsilateral lymph node, 3 cm or less in greatest dimension N2 Metastasis as specified in N2a, 2b, 2c below N2a Metastasis in a single ipsilateral lymph node, more than 3 cm but not more than 6 cm in greatest dimension N2b Metastasis in multiple ipsilateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension N2c Metastasis in bilateral or contralateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension N3 Metastasis in a lymph node more than 6 cm in greatest dimension</p> <p>Note: Midline nodes are considered ipsilateral nodes.</p> <p>M – Distant metastasis MX Distant metastasis cannot be assessed M0 No distant metastasis M1 Distant metastasis</p> <p>Stage grouping</p> <table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>Stage 0</td><td>Tis</td><td>N0</td><td>M0</td></tr> <tr><td>Stage I</td><td>T1</td><td>N0</td><td>M0</td></tr> <tr><td>Stage II</td><td>T2</td><td>N0</td><td>M0</td></tr> <tr><td>Stage III</td><td>T1, T2</td><td>N1</td><td>M0</td></tr> <tr><td></td><td>T3</td><td>N0, N1</td><td>M0</td></tr> <tr><td>Stage IVA</td><td>T1, T2, T3</td><td>N2</td><td>M0</td></tr> <tr><td></td><td>T4a</td><td>N0, N1, N2</td><td>M0</td></tr> <tr><td>Stage IVB</td><td>Any T</td><td>N3</td><td>M0</td></tr> <tr><td></td><td>T4b</td><td>Any N</td><td>M0</td></tr> <tr><td>Stage IVC</td><td>Any T</td><td>Any N</td><td>M1</td></tr> </table> <p>## The regional lymph nodes are the cervical nodes.</p> | Stage 0 | Tis | N0 | M0 | Stage I | T1 | N0 | M0 | Stage II | T2 | N0 | M0 | Stage III | T1, T2 | N1 | M0 | | T3 | N0, N1 | M0 | Stage IVA | T1, T2, T3 | N2 | M0 | | T4a | N0, N1, N2 | M0 | Stage IVB | Any T | N3 | M0 | | T4b | Any N | M0 | Stage IVC | Any T | Any N | M1 | <p>TNM classification of carcinomas of the oropharynx^{1,2}</p> <p>T – Primary tumour TX Primary tumour cannot be assessed T0 No evidence of primary tumour Tis Carcinoma in situ T1 Tumour 2 cm or less in greatest dimension T2 Tumour more than 2 cm but not more than 4 cm in greatest dimension T3 Tumour more than 4 cm in greatest dimension T4a Tumour invades any of the following: larynx, deep/extrinsic muscle of tongue (genioglossus, hyoglossus, palatoglossus, and styloglossus), medial pterygoid, hard palate, and mandible T4b Tumour invades any of the following: lateral pterygoid muscle, pterygoid plates, lateral nasopharynx, skull base; or encases the carotid artery</p> <p>N – Regional lymph nodes## NX Regional lymph nodes cannot be assessed N0 No regional lymph node metastasis N1 Metastasis in a single ipsilateral lymph node, 3 cm or less in greatest dimension N2 Metastasis as specified in N2a, 2b, 2c below N2a Metastasis in a single ipsilateral lymph node, more than 3 cm but not more than 6 cm in greatest dimension N2b Metastasis in multiple ipsilateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension N2c Metastasis in bilateral or contralateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension N3 Metastasis in a lymph node more than 6 cm in greatest dimension</p> <p>Note: Midline nodes are considered ipsilateral nodes.</p> <p>M – Distant metastasis MX Distant metastasis cannot be assessed M0 No distant metastasis M1 Distant metastasis</p> <p>Stage grouping</p> <table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>Stage 0</td><td>Tis</td><td>N0</td><td>M0</td></tr> <tr><td>Stage I</td><td>T1</td><td>N0</td><td>M0</td></tr> <tr><td>Stage II</td><td>T2</td><td>N0</td><td>M0</td></tr> <tr><td>Stage III</td><td>T1, T2</td><td>N1</td><td>M0</td></tr> <tr><td></td><td>T3</td><td>N0, N1</td><td>M0</td></tr> <tr><td>Stage IVA</td><td>T1, T2, T3</td><td>N2</td><td>M0</td></tr> <tr><td></td><td>T4a</td><td>N0, N1, N2</td><td>M0</td></tr> <tr><td>Stage IVB</td><td>T4b</td><td>Any N</td><td>M0</td></tr> <tr><td>Stage IVC</td><td>Any T</td><td>N3</td><td>M0</td></tr> <tr><td></td><td>Any T</td><td>Any N</td><td>M1</td></tr> </table> <p>## The regional lymph nodes are the cervical nodes.</p> | Stage 0 | Tis | N0 | M0 | Stage I | T1 | N0 | M0 | Stage II | T2 | N0 | M0 | Stage III | T1, T2 | N1 | M0 | | T3 | N0, N1 | M0 | Stage IVA | T1, T2, T3 | N2 | M0 | | T4a | N0, N1, N2 | M0 | Stage IVB | T4b | Any N | M0 | Stage IVC | Any T | N3 | M0 | | Any T | Any N | M1 |
| Stage 0 | Tis | N0 | M0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Stage I | T1 | N0 | M0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Stage II | T2 | N0 | M0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Stage III | T1, T2 | N1 | M0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | T3 | N0, N1 | M0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Stage IVA | T1, T2, T3 | N2 | M0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | T4a | N0, N1, N2 | M0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Stage IVB | Any T | N3 | M0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | T4b | Any N | M0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Stage IVC | Any T | Any N | M1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Stage 0 | Tis | N0 | M0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Stage I | T1 | N0 | M0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Stage II | T2 | N0 | M0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Stage III | T1, T2 | N1 | M0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | T3 | N0, N1 | M0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Stage IVA | T1, T2, T3 | N2 | M0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | T4a | N0, N1, N2 | M0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Stage IVB | T4b | Any N | M0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Stage IVC | Any T | N3 | M0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Any T | Any N | M1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

¹ (947,2418).
² A help desk for specific questions about the TNM classification is available at www.uicc.org/index.php?id=508.

c. Recul et suivi

Le suivi clinique moyen fut de 36 mois. Sur la série initiale, un seul perdu de vue fut à déplorer.

Six décès liés à la maladie survinrent:

Un patient décéda des suites d'un hépatocarcinome

Un patient développa un carcinome pulmonaire

Deux patients présentèrent une récurrence cervicale avec évolution défavorable (l'un sous forme d'une carcinose cervicale, l'autre sous forme métastatique pulmonaire)

Un patient présenta une récurrence locale linguale

Un patient développa une lésion métachrone de type carcinome épidermoïde de l'œsophage.

Cinq patients présentèrent une deuxième localisation diagnostiquée lors de la surveillance systématique.

Deux patients durent subir une reprise chirurgicale pour récurrence locale en marge de la résection tumorale initiale.

d- technique d'analyse du ganglion sentinelle

Chaque ganglion sentinelle a fait l'objet de 3 analyses: une étude peropératoire, une histologique standard après inclusion en paraffine et une étude immunohistochimique sur coupes sériées.

Pour chaque patient de l'étude, les ganglions prélevés comme ganglions sentinelles ont en premier lieu été analysés en peropératoire. Immédiatement envoyés frais au laboratoire d'Anatomie Pathologique, ils ont été coupés selon de grand axe avec une étude cytologique sur lames d'apposition. Puis le ganglion sentinelle est coupé chaque 2-3mm et mis en cassettes pour une inclusion en paraffine et une étude histologique par coloration hématoxyline- éosine standard.

Après cette lecture de coupes colorées à l'hématéine éosine chaque bloc a été coupé au cryotome jusqu'à épuisement du prélèvement. Deux coupes de 5 micromètres ont été montées tous les 250 micromètres. La coloration en immunohistochimie a été réalisée sur un automate de marque Ventana (Benchmark XT VENTANA médical Systems Automate). L'anticorps primaire est un mélange d'anticorps anticytokératines AE1-AE3 (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK)

à la dilution de 1/200°. L'anticorps secondaire de révélation provenait d'un sérum de chèvre (Ventana DAB Detection Kit).

Les lames ont ensuite été lavées au détergent doux, rincées à deux reprises, et déshydratées à l'aide de bains d'alcool de degré croissant.

e. Classification histopathologique des métastases

La classification d'Hermanek 6 a permis de déterminer le statut métastatique des ganglions sentinelles :

Ganglions indemnes de toute cellule métastatique visible.

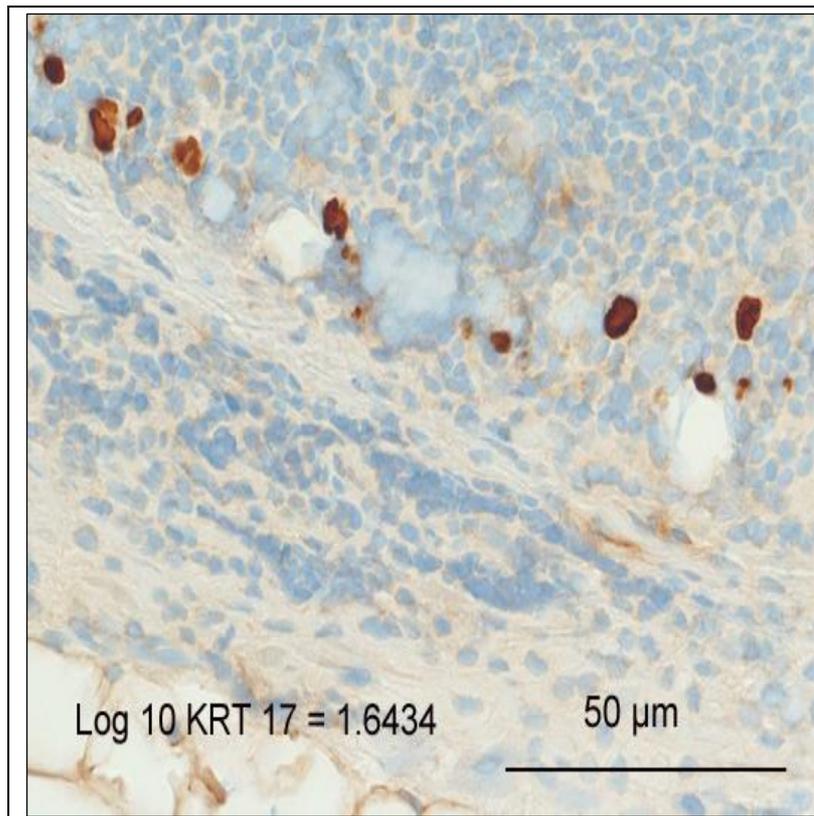
Ganglions présentant des cellules tumorales isolées CTI, considérés comme non métastatique. Il s'agit de cellules considérées en transit dans les vaisseaux sinusoides sous capsulaires. Leur capacité d'invasion reste pour l'instant à déterminer. D'après Hermanek, leur taille dans le plus grand axe doit être strictement inférieure à 200 micromètres.

Ganglions présentant des micro métastases comprises entre 200 micromètres et 2 millimètres.

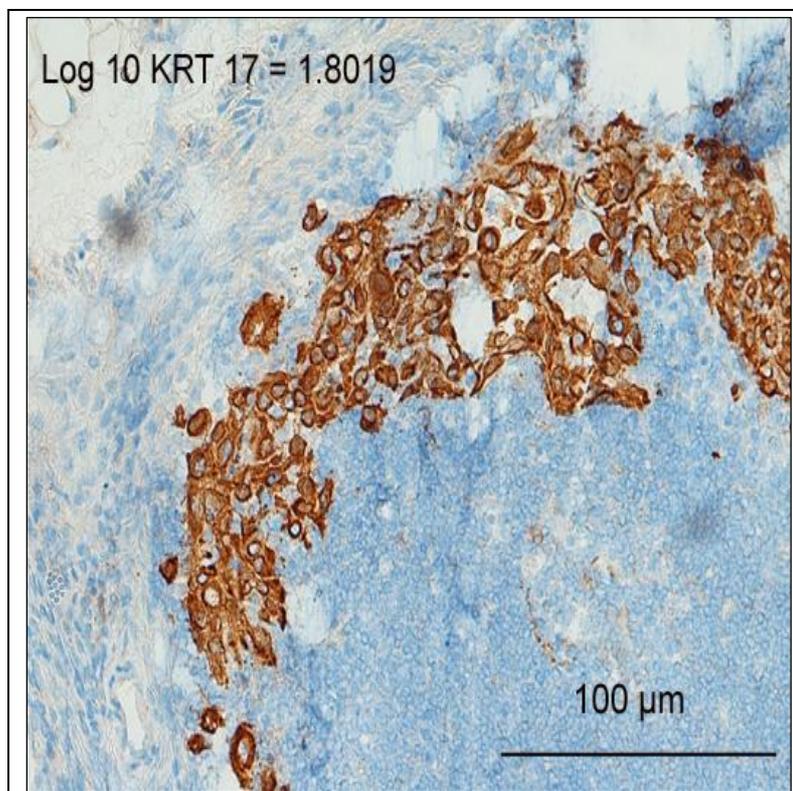
Les macro métastases sont des lésions intraganglionnaire de plus de 2millimètres.

Les ganglions présentant un envahissement de la graisse péri-capsulaire ont été classés en rupture capsulaire pNR+. Par définition, les métastases venant seulement au contact de la capsule ont été considérées pNR-.

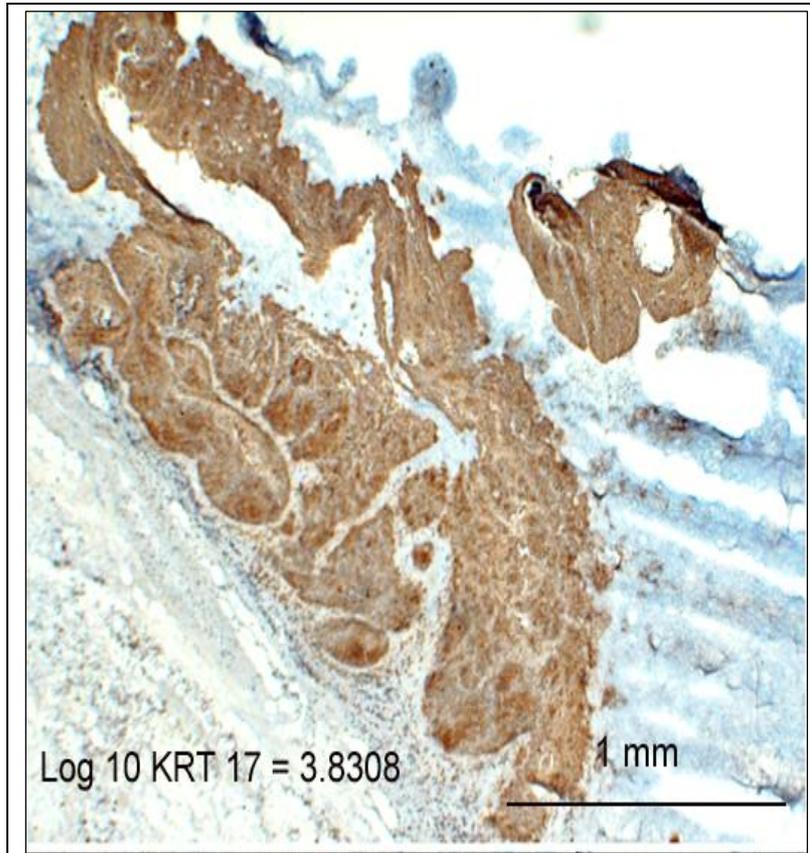
Figure 1. Classification d'Hermanek



Cellules tumorales isolées marquées par les CK AE1/AE3 $< 0.2\text{mm}$. (X40)



Micrométastase entre 0.2 et 2mm. (X40)



Macrométastase >2mm. (X40)

II-2- Résultats

a.Repérage spatial des ganglions sentinelles:

Le diagnostic topographique des ganglions sentinelles a reposé sur la détection per-opératoire des ganglions radioactifs dans les niveaux chirurgicaux du cou.

La grande majorité des patients présentaient plusieurs GS (moyenne : 2,96) répartis dans des niveaux contigus. Néanmoins chez 8 patients (16%), les ganglions étaient exclusivement localisés dans le niveau III. Enfin dans un cas unique, le seul GS repéré était situé dans le niveau IV ; il s'agissait d'un patient présentant une lésion pT1 du bord libre droit de la langue mobile. A noter, dans un cas de tumeur primitive oropharyngée, un ganglion sentinelle fut localisé en région rétro-pharyngée. Lors de la procédure chirurgicale, ce ganglion fut laissé en place.

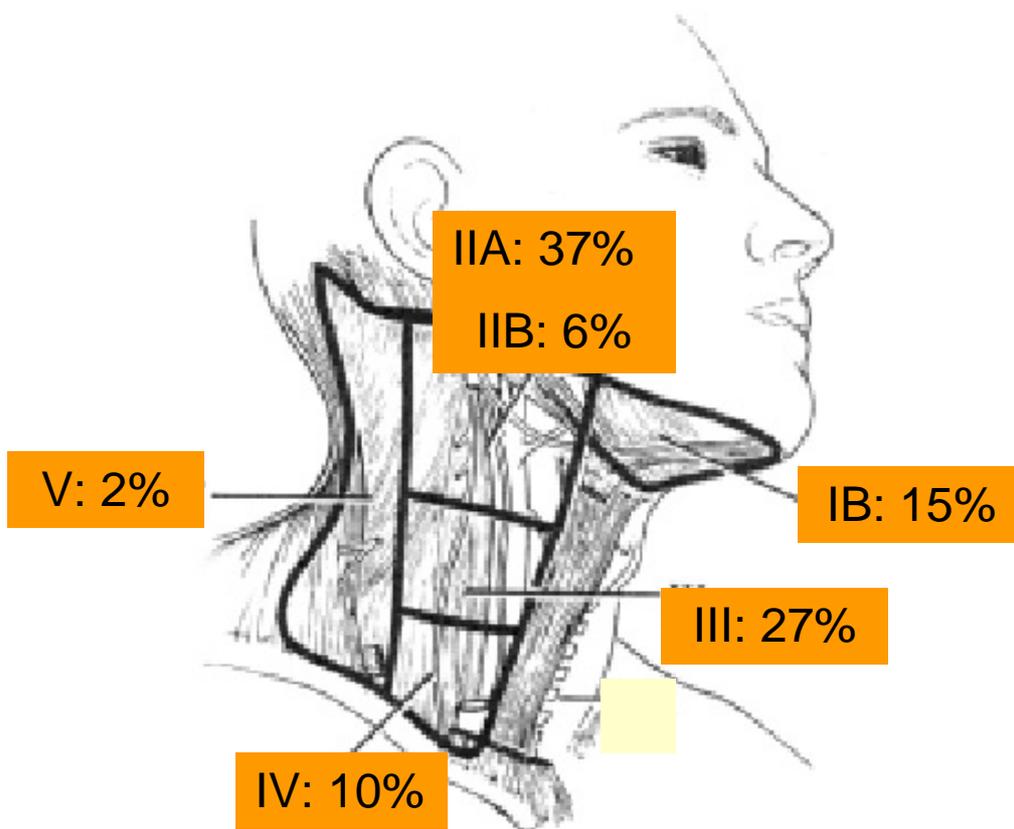


Figure 2: repérage spatial du ganglion sentinelle

b. Analyse standard sur les évidements cervicaux

L'analyse standard a consisté en une étude histologique :

des ganglions excisés lors des curages fonctionnels, soient 1146 prélèvements (moyenne 16,8 par dissection)

des ganglions sentinelles par une technique peropératoire et une analyse standard préliminaire, soient 148 échantillons.

Après interprétation, 09 patients furent considérés pN+. Parmi les ganglions sentinelles, 5 apparurent métastatiques en technique per opératoire et 4 prélèvements supplémentaires furent positifs en analyse standard. Les métastases diagnostiquées en technique peroperatoire étaient toutes des macrométastases avec 2 micrométastases et 2 macrométastases identifiées par la technique standard. (tableau 1).

c. Analyse en immunohistochimie sur coupes semisériées SS-IHC

Sur 148 prélèvements, 24 ganglions sentinelles ont été considérés métastatiques chez 18 patients. 9 macrométastases et 15 micrométastases furent identifiées.

Tableau 1 tableau comparatif entre le statut pSN (0 et +) et pN (0 et +)

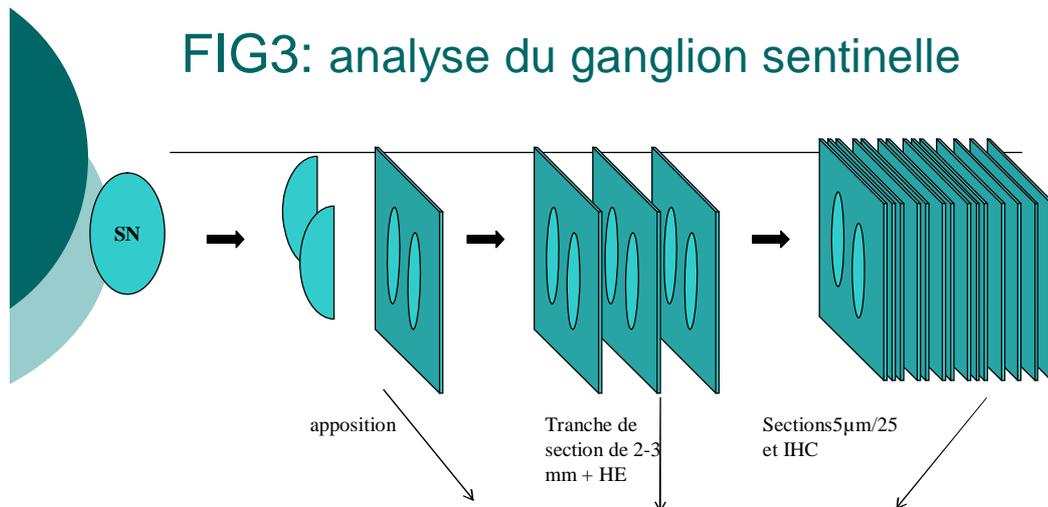
| | pN+ | pNO | Total |
|-------|---------|----------|-----------|
| pSN+ | 9 (18%) | 9 (18%) | 18 (36%) |
| pSNO | 0 | 32 (64%) | 32 (64%) |
| Total | 9 (18%) | 41 (74%) | 50 (100%) |

Les ganglions positifs contenaient au moins une lésion métastatique. Dans certains échantillons, on avait mis en évidence plusieurs lésions concomitantes. Au maximum, il a été mis en évidence au sein d'un ganglion sentinelle, une macrométastase et 8 micrométastases.

Dans cette situation, le classement le plus péjoratif fut pris en compte pour la stadification.

Par ailleurs, 14 cas de cellules tumorales isolées ont été identifiés. En l'état actuel des connaissances, ces lésions ne doivent pas être considérées comme des métastases à proprement parler, mais comme des cellules en transit à potentiel métastatique.

FIG3: analyse du ganglion sentinelle



| Statut SN | Technique d'analyse | | |
|----------------------------|---------------------|--------------------|--------|
| | per opérateur | Analyse définitive | SS-IHC |
| Cellules tumorales isolées | 0 | 0 | 14 |
| Micrométastase | 0 | 2 | 15 |
| Macrométastase | 5 | 7 | 9 |

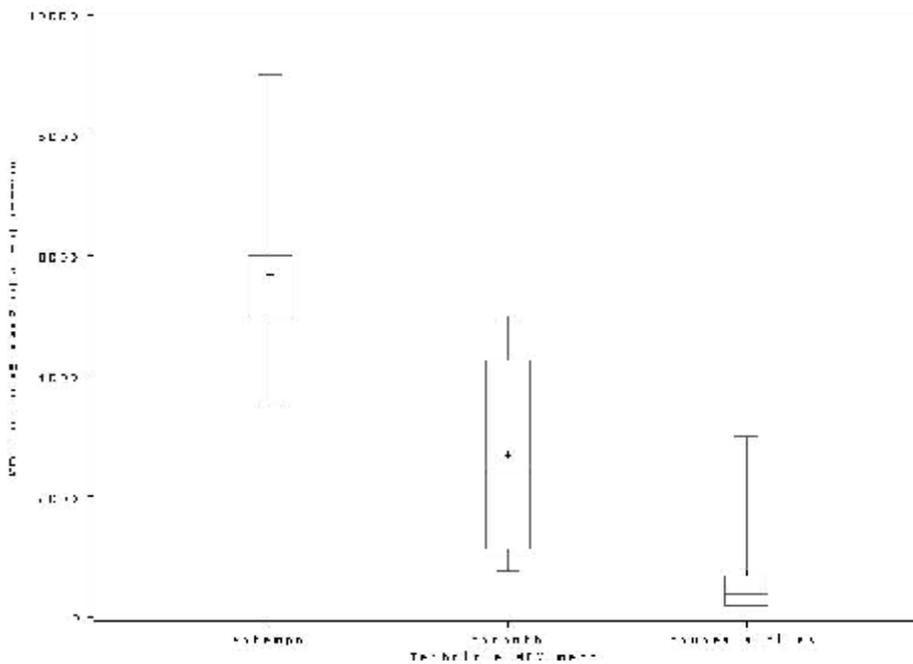


Figure 4. Répartition de la taille des métastases en fonction de la technique utilisée

d. Taille des métastases :

Respectivement, l'analyse per opératoire et l'analyse de routine avaient mis en évidence des métastases avec taille médiane de 5 millimètres et 2,5 millimètres. Enfin, en technique de SS-IHC, la taille médiane des métastases identifiées était 390 micromètres. De façon prévisible, plus on affine l'étude des ganglions sentinelles, plus on détecte des métastases de taille progressivement décroissante. Ainsi, on obtient la confirmation que la technique de SS-IHC est plus performante que l'analyse de routine ; elle-même étant plus performante que l'étude peropératoire. La corrélation entre la technique la plus performante et la taille dans le diagnostic des métastases ganglionnaire était significative ($P = 0.001$).

e- Upstaging ganglionnaire:

En considérant la technique de SS-IHC, 9 patients furent upstagés de pN0 à un statut pN(SN)+. De même, 6 patients initialement classés pN1 furent finalement considérés pN(SN)2b.

Au total, il faut considérer que 30% des patients subirent un upstaging ganglionnaire, par la technique du ganglion sentinelle.

Tableau 2: up staging ganglionnaire par le ganglion sentinelle

| Surclassement du stade | | | Nombre de patients |
|------------------------|---|-------|--------------------|
| pN0 | → | pSN1 | 4 |
| pN0 | → | pSN2b | 5 |
| pN1 | → | pSN2b | 6 |
| | | | Total = 15 /50 |

II-3- DISCUSSION

a. L'analyse du ganglion sentinelle avec immunohistochimie sur coupes sérieées est une technique sensible

Pendant des décennies, le caractère N0 des évidements cervicaux pratiqués garantissaient au patient à la fois le diagnostic d'un stade précoce de la maladie et son appartenance à une population de bon pronostic. De cette notion histologique découlait une prise en charge chirurgicale exclusive en l'absence d'autre facteur de mauvais pronostic ayant nécessité le recours à un traitement adjuvant par radiothérapie. La survenue de récurrence cervicale en région anatomique préalablement  vid e remettait en question l'efficacité thérapeutique ainsi que la certitude diagnostique première.

Le développement de la technique du ganglion sentinelle en ORL, sur le modèle chirurgical du cancer mammaire a permis de mettre en évidence la présence de lésions métastatiques de petites tailles. L'examen histologique avec coloration en Hématoxyline Eosine de quelques coupes de plus grand axe des ganglions montrait ses limites pour le diagnostic de métastases de moins de 350 micromètres 7.

Dans cette série de patients, la technique du ganglion sentinelle a été appliquée de façon systématique dès lors que le statut clinico-radiologique faisait état d'un stade cT1T2N0.

Comme attendu, le staging cervical pN(sn) obtenu par SS-IHC fut systématiquement équivalent ou supérieur à l'évaluation pN dans les évidements cervicaux. La technique du ganglion sentinelle présente une sensibilité et une valeur prédictive négative de 100%. Par ailleurs, aucune récurrence cervicale ne fut à déplorer chez les patients pN(sn)0, après 2 ans de recul.

A partir de ces données et en l'absence d'étude randomisée prospective, l'application en routine ne peut être généralisée. Toutefois, en sélectionnant les patients et en utilisant une technique rigoureuse, le ganglion sentinelle pourrait à terme remplacer l'évidement cervical fonctionnel pour le staging ganglionnaire des cous cN0.

b. L'analyse du ganglion sentinelle avec immunohistochimie sur coupes s riees permet un meilleur staging des patients

A partir de ces données montrant que la technique du ganglion sentinelle fait au minimum jeu égal avec l'histologie standard, on peut s'intéresser à l'upgrading ganglionnaire. En effet, l'étude histologique standard ne permet de diagnostiquer que 50% des patients présentant un statut métastatique. A contrario, la technique du ganglion sentinelle présente une sensibilité de 100%.

4 patients présenta un upgrading pN0 – pN1(sn), 5 patients (10%) présentèrent un upgrading pN0 – pN2b(sn), et 6 patients furent upgrad s pN1 – pN2b(sn). Au total, 30% des patients de cette étude subirent un upgrading, par l'intermédiaire du ganglion sentinelle.

Deux patients m rit rent une étude plus approfondie de l'évolution clinique post-opératoire. Il s'agit de deux patients, dont le décès peut être directement imputé à une récurrence cervicale :

Le premier développa des métastases pulmonaires après qu'une récurrence cervicale est apparue, à 6 mois de la chirurgie première. Il avait été rétrospectivement considéré pN1, par la mise en évidence d'une micrométastase en technique de routine dans l'un des trois ganglions sentinelles excisés. Il n'avait toutefois pas bénéficié d'une radiothérapie postopératoire lors de la pris en charge initiale.

Chez le second, une adénopathie rétropharyngée avait été mise en évidence lors de la lymphoscintigraphie, sans que celle-ci soit excisée lors de la chirurgie d'évidement. Dans les suites, il développa une carcinose cervicale qui présenta sans que la radiochimiothérapie adjuvante initiée ne puisse permettre d'obtenir un contrôle évolutif. Le décès survient après 18 mois.

Ces données sont en faveur d'une récurrence locale à point de départ d'une métastase ganglionnaire première ignorée. La survenue de récurrence cervicale, chez les patients pN0, doit faire évoquer la présence de métastase occulte. Dans ce travail, le nombre modeste de sujets et un taux de prévalence faible de récurrence cervicale 5% à 10% 8-9, ne permettent pas d'obtenir des résultats statistiquement représentatifs. A long terme (au-delà de 6 ans, le caractère pN+(sn) apparaît comme un facteur de mauvais pronostic 10. Ainsi, il est acquis de proposer un traitement

adjuvant après chirurgie première pour tous les patients présentant un statut pN+(sn).

c. Perspectives d'analyse extemporanée?

L'ensemble de ces données confirme la reproductibilité et la valeur statistique du ganglion sentinelle dans la prise en charge des cNO.

L'analyse histologique standard a montré ses limites. L'étude immunohistochimique sur coupes semi-sérialées représente le gold standard dans l'étude des ganglions sentinelles 11. Néanmoins, celle-ci est chronophage en terme de manipulation et de lecture par le pathologiste. Enfin, malgré un protocole rôdé, il demeure difficile de rendre des résultats en moins de 24 à 36 heures. Ainsi cette technique ne permet pas de concevoir une chirurgie en un temps opératoire, et expose le patient à la probabilité d'une réintervention.

III- Deuxième partie: Recherche de facteurs histologiques prédictifs de micrométastases

Elle consiste à une évaluation de certains paramètres histologiques permettant de soulever dans ces carcinomes épidermoïdes de la cavité orale et de l'oropharynx de faible stade (pNOMOT1-T2), un sous type de haut risque de progression tumorale pouvant bénéficier d'une stratégie thérapeutique plus adaptée.

Par ailleurs, nous allons évaluer par étude immunohistochimique des facteurs intervenant dans la prolifération et l'invasion tumorale à savoir l'expression de l'EGFR, du VEGF (vascular endothelial growth factor), et de D2-40/ki67 (pour évaluer la prolifération lymphatique). Nous établirons également le statut HPV de ces tumeurs (P16 et hybridation avec les sondes HPV16/18).

Nous chercherons d'éventuelles corrélations entre ces différents marqueurs tissulaires et la présence de métastases ganglionnaires.

III-1- MATERIELS ET METHODE

a.Evaluation des paramètres histologiques

Les paramètres histologiques évalués sur les pièces de résection chirurgicale de la tumeur sont

La taille tumorale (épaisseur tumorale (mm), largeur tumorale (mm)), le front d'invasion,

L'invasion musculaire, l'invasion nerveuse, les embolies vasculaires et les marges d'exérèses.

b. Technique de l'étude immunohistochimique:

Tous les tests ont été effectués sur des coupes en paraffine de 5 µm préalablement fixées au formol. Les lames sont mises durant la nuit dans un four à air chaud à 56 ° C puis successivement déparaffinées par du xylène puis réhydratées dans une série de bain dégressif d'éthanol. Le démasquage a été réalisé par immersion dans le tampon citrate / EDTA (Sigma, Aldrich, St Quentin Fallavier, France) à pH=6 et chauffage (40 min à 100°C).

Les anticorps primaires utilisés sont:

- L'EGFR monoclonal de la souris clone: 31G7
- Le VEGFR-3 monoclonal de la souris de Novocastra

- Le KI67 monoclonal de la souris, clone MIB-1
- Le D2-40 monoclonal de la souris
- La P16 monoclonal de la souris de Novocastra:

Une dilution de 1:25 pour les deux EGFR et VEGFR-3 a été utilisée; 1:50 pour D2-40, 1:20 pour la P16, 1:75 pour le KI67.

Les anticorps secondaires biotinylés (anti- IgG de lapin, de chèvre, de rat ou de souris) ont été utilisés au 1/500. Toutes les réactions en immunopéroxydase ont été réalisées avec la méthode avidine-biotine et le 3'3'diaminobenzidine comme chromogène. Pour les tissus humains, cette méthode a été réalisée à l'aide de l'automate Ventana (Ventana Nexes, AR).

Pour les doubles marquages, une seconde coloration a été réalisée avec la phosphatase alcaline et révélée par le Fast Red (Ventana Nexes, AR). Les sections ont été finalement contre-colorées par l'hématoxyline.

c. Evaluation des résultats immunohistochimiques

L'EGFR (Epidermal growth Factor Recepteur) ou récepteurs à l'EGF sont des récepteurs, situés normalement à la surface de toutes les cellules épithéliales de l'organisme. Ils sont impliqués dans la vie normale de la cellule dans la division cellulaire et la prolifération de toutes les cellules. Dans les lésions précancéreuses et cancéreuses, on observe une surexpression de ce récepteur à l'EGF avec pour conséquences une augmentation du potentiel de prolifération cellulaire associée à une résistance à l'apoptose. [12].

L'immunomarquage par l'EGFR a été évalué et scoré:

- score 0: absence de marquage au niveau de toutes les cellules ou positivité dans moins de 10% de l'ensemble de la prolifération.
- score 1+: marquage membranaire faible dans moins de 10% des cellules.
- score 2+: marquage membranaire modérée dans plus de 10% des cellules.
- score 3+: marquage membranaire fort dans plus de 10% des cellules.

Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est le prototype du facteur de croissance vasculaire entraînant la formation de néovaisseaux. Il existe 3 récepteurs du VEGF: VEGF R1, VEGF R2. Récemment un troisième récepteur fut identifié: VEGF R3 (FLT4) qui est un récepteur de tyrosine kinase de structure similaire aux VEGFR-1 et VEGFR-2 mais ne liant pas le VEGF. Le VEGF R3 lie en particulier le VEGF C.

Le système VEGF R3/ VEGF C joue un rôle important dans l'élaboration des vaisseaux lymphatiques. Le VEGF se trouve à proximité des zones hypoxiques de nécrose tissulaire et est synthétisé dans les cellules cancéreuses. [13].

Le marquage par le VEGF R3 a été recherché dans les cellules tumorales et dans les lymphatiques.

Le double marquage D2-40/KI67 a été évalué en deux temps, une évaluation en périphérie de la tumeur du nombre des lymphatiques par 1mm², puis la détection des lymphatiques proliférant en établissant un score:

-score 0: marquage négative des cellules endothéliales lymphatiques par le KI67.

-score 1: marquage positive des cellules endothéliales lymphatiques par le KI67.

Dans notre étude, nous avons évalué l'expression de la p16 par les cellules tumorales, compléter en cas de positivité par l'hybridation in situ HPV16/18.

III-2- RESULTATS

a- Aspects clinico-pathologiques :

Parmi les 50 patients de l'étude, 16 présentaient une lésion de l'oropharynx dont 12 étaient latérales et 4 médianes ou franchissant la ligne médiane. Trente sept correspondaient à des atteintes de la cavité buccale ou de la langue mobile.

Au total, selon la classification pTNM, 23 patients présentaient une lésion pT1, 27 une lésion pT2.

La taille tumorale médiane était de 9.22mm (1,5 et 20,2).

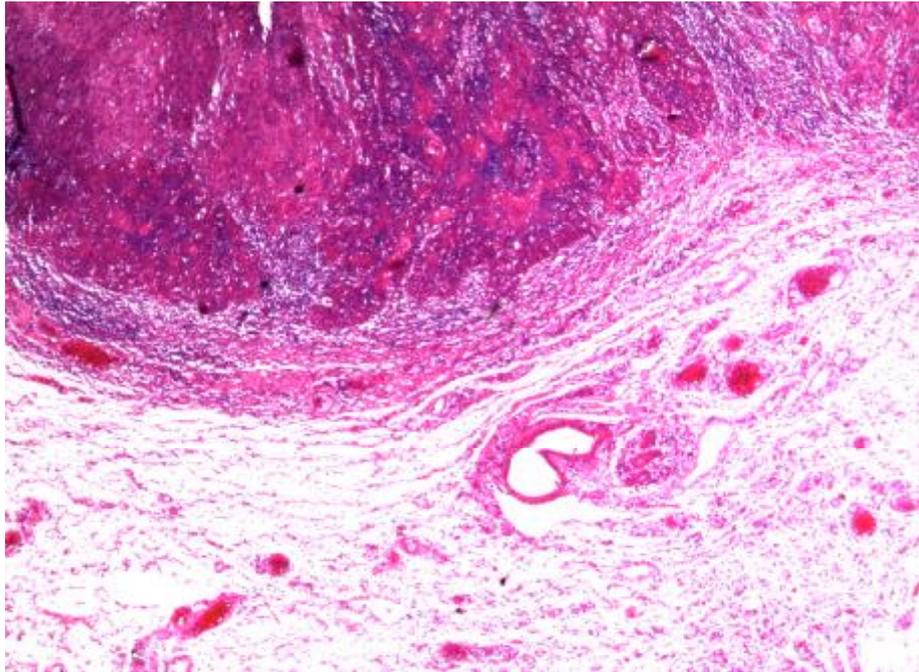
Le front d'invasion a été subdivisé en 3 types :

Type 1 : front d'invasion continu par pushing (30cas)

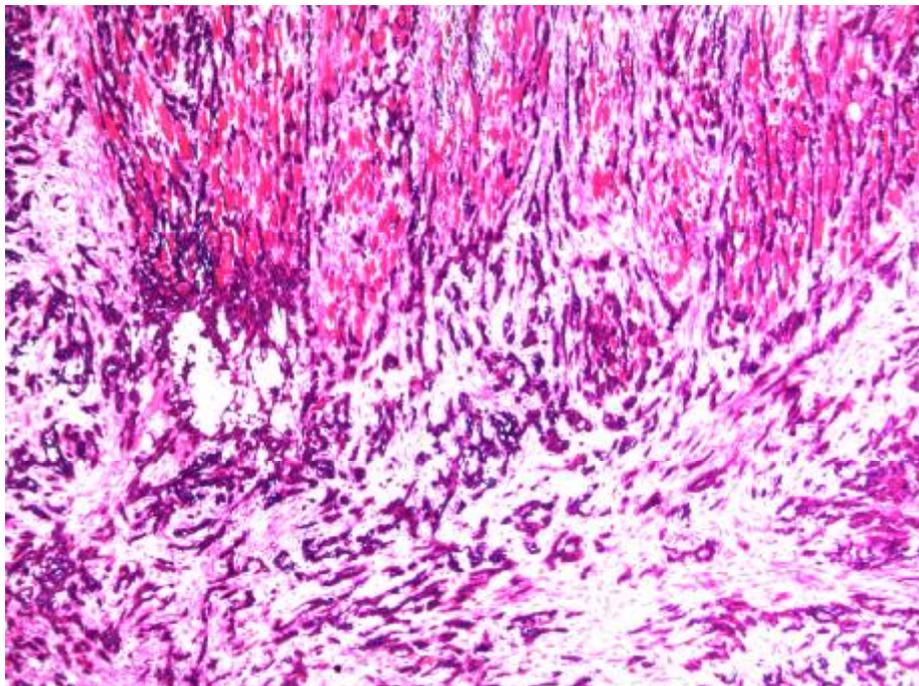
Type 2 : front d'invasion spiculé (17cas)

Type 3 : présence d'un amas tumoral supérieur à 1mm loin de la tumeur principale (3cas)

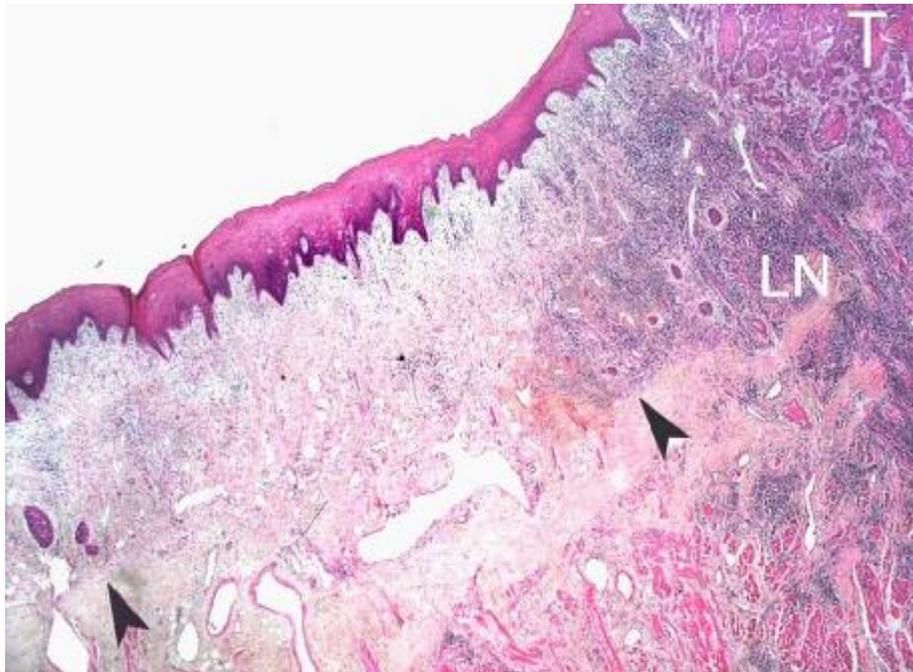
Figure 5: les différents fronts d'invasion



Type 1 : front d'invasion continu par pushing. (X20)



Type 2 : front d'invasion spiculé. (X20)



Type 3 : présence d'un amas tumoral supérieur à 1mm loin de la tumeur principale. (X20)

Les embolies vasculaires ont été retrouvées dans 16 cas, les invasions nerveuses dans 11 cas et l'invasion musculaire dans 23 cas avec une épaisseur de l'infiltration allant de 1,4 mm à 9,25 mm.

Les marges chirurgicales étaient histologiquement précisées:

Marge supérieure ou égale à 5 = marges saines. (score 0) (80% cas)

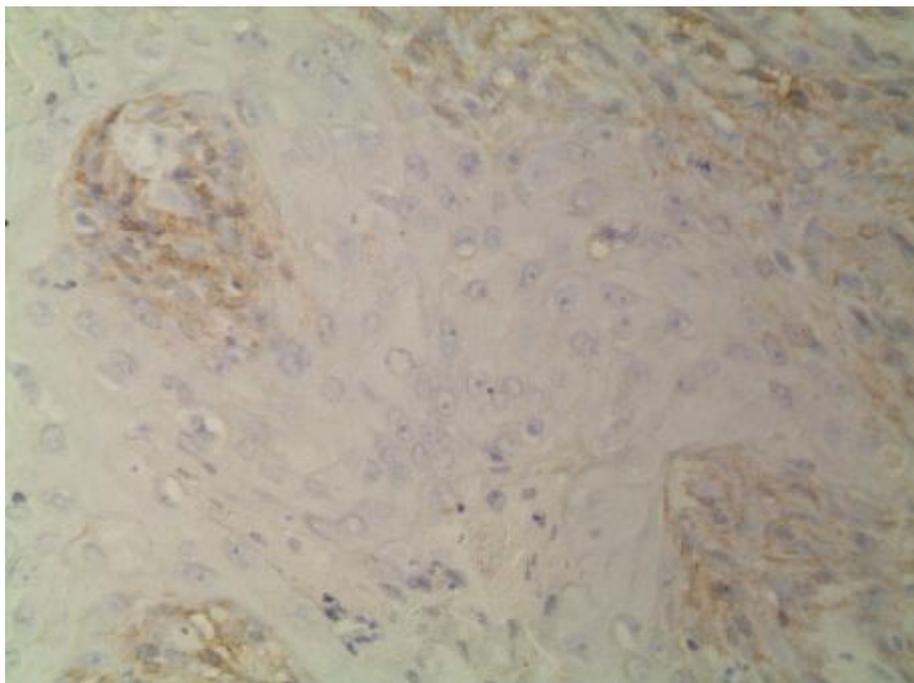
Marge <5mm = tumeur proche des limites chirurgicales. (Score 1) (14% cas)

Marge positive si la limite chirurgicale passe en pleine tumeur (score 2) (6% cas)

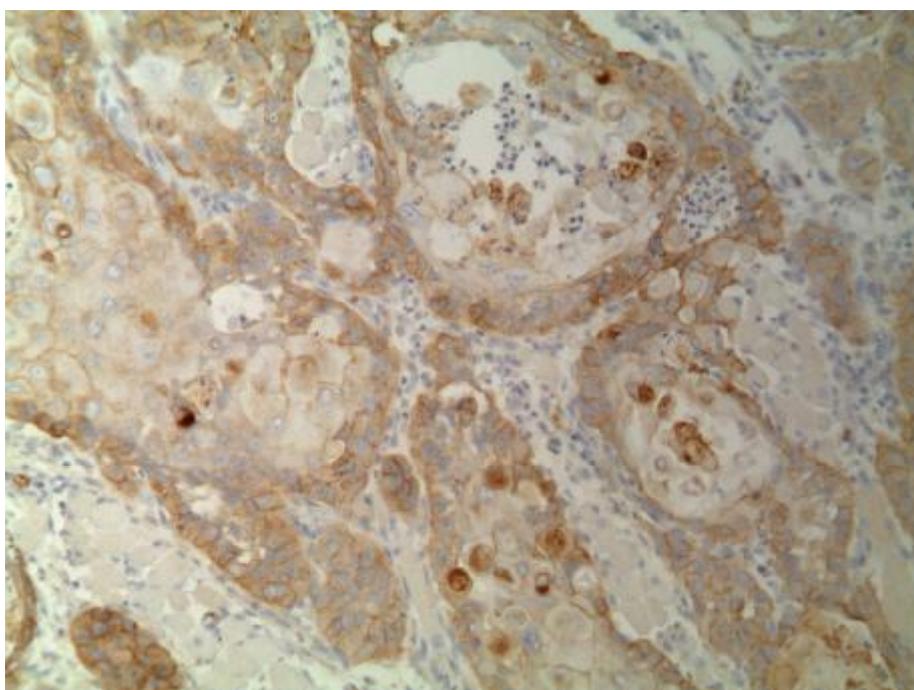
b- Etude immunohistochimiques:

Evaluation de l'expression de l'EGFR (Figure 6): quarante deux tumeurs (80%) exprimaient un marquage membranaire et/ou cytoplasmique de l'EGFR avec un marquage normal au niveau des couches basales de l'épithélium malpighien non tumoral. Cette expression était faible (10%), modérée (16%) et intense (58%).

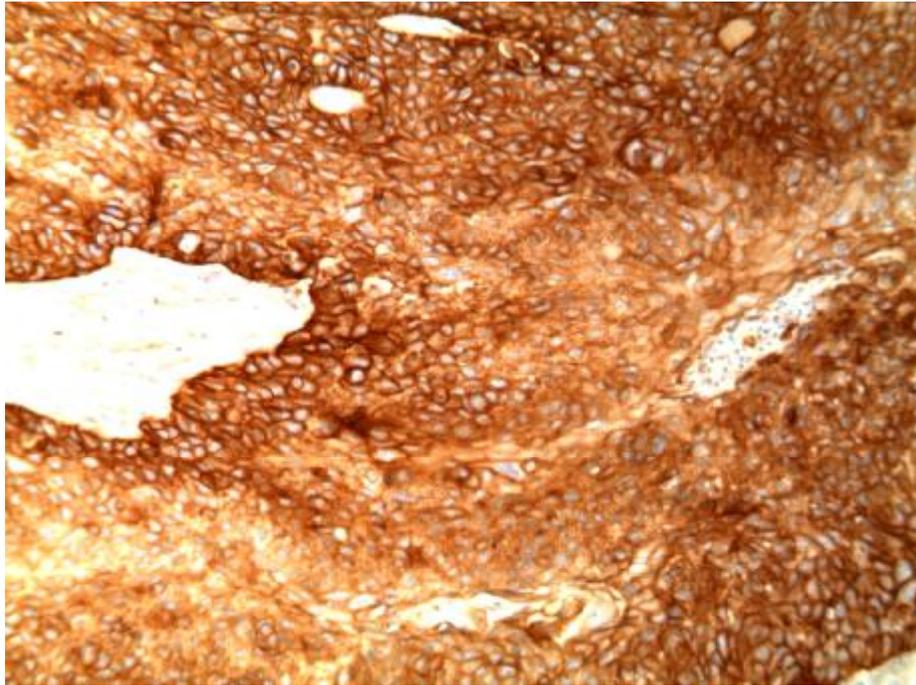
FIG 6: étude immunohistochimique de l'EGFR



score 1+: marquage membranaire faible dans plus de 10% des cellules. (X40)



Score 2+: marquage membranaire modérée dans plus de 10% des cellules.
(x20)



Score 3+: marquage membranaire fort dans plus de 10% des cellules. (X20)

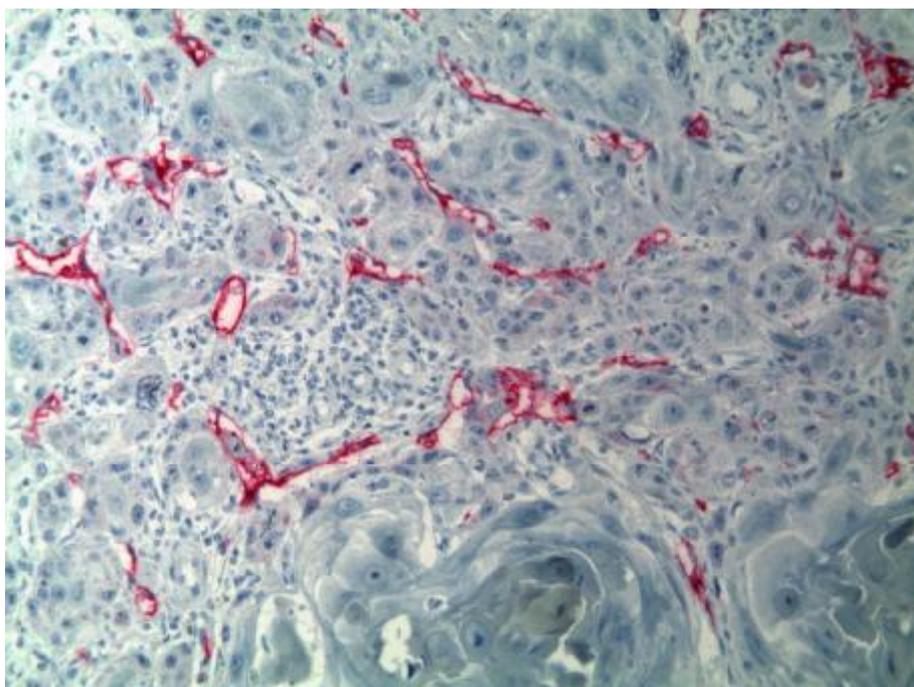
Evaluation du VEGF R3: Traditionnellement, il marque les cellules endothéliales des lymphatiques lui conférant la qualité du principal récepteur promoteur de la lymphogénèse. Actuellement, on a mis en évidence l'expression des récepteurs du VEGF par de nombreuses tumeurs solides élargissant son spectre d'action en agissant sur le fonctionnement des cellules tumorales. [14].

Ce marquage n'était pas exprimé dans les 50 cas avec un témoin externe positif (glioblastome).

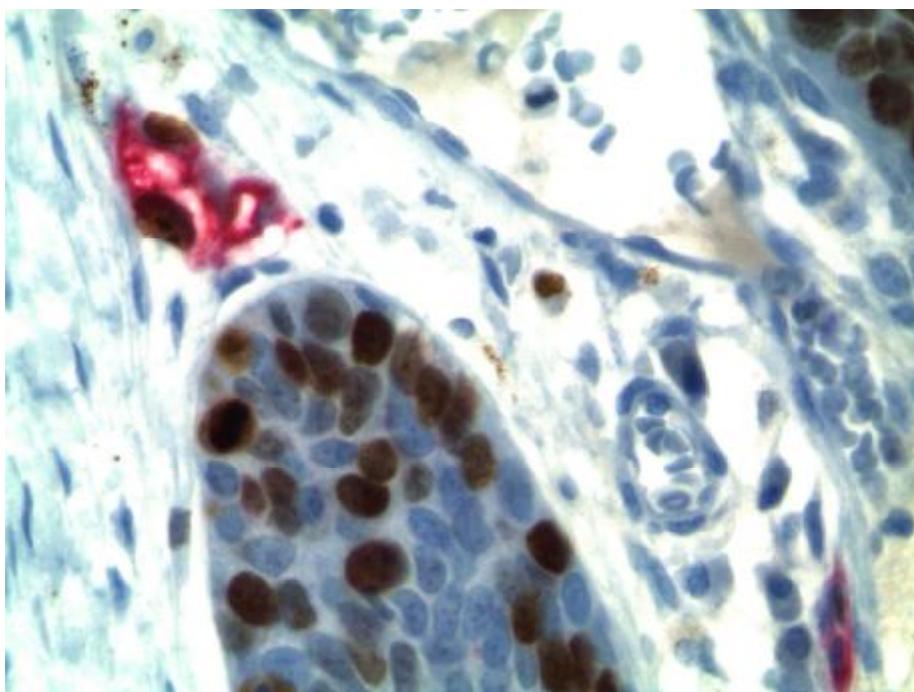
Evaluation de l'expression du double marquage D2-40/Ki67 (Figure 7): Le D2-40 marque les cellules endothéliales des lymphatiques sans marquage des vaisseaux sanguins. Il a été identifié entre les îlots tumoraux et en périphérie de la tumeur. Le compte a mis en évidence 20 lymphatiques/mm² en moyenne avec des extrêmes allant de 1 à 56 lymphatiques/1mm². Ailleurs, on note une absence de marquage dans un seul cas. Dans 80% des cas, les cellules endothéliales des lymphatiques sont marquées par le Ki67. Alors que dans 20% des cas, les lymphatiques ne sont pas proliférant.

Ailleurs, aucun cas d'invasion tumorale lymphatique n'a été détecté.

Figure 7: double marquage D2-40/KI67



Les vaisseaux lymphatiques marqués en rouge par le D2-40. (X20)



Double marquage D2-40/ki67 : les lymphatiques en rouge et les noyaux des cellules endothéliales marqués par le marron. (X40)

Evaluation de l'expression de la p16 et HPV16/18 (Figure 8): Les virus HPV (Human papillomavirus) à haut risque oncogène (en particuliers HPV16/18) sont des virus à ADN double brin, connus pour leur rôle dans la carcinogénèse des carcinomes anogénitaux, en particuliers cervicaux. L'inactivation des protéines p53 et pRB, par les oncoprotéines virales E6 et E7 stimule la prolifération cellulaire et induit des instabilités génomiques. Par ailleurs, l'inhibition de pRB entraîne une surexpression de la protéine p16. Cette surexpression témoin de la présence de virus HPV est utilisée comme marqueur indirect de ces infections.

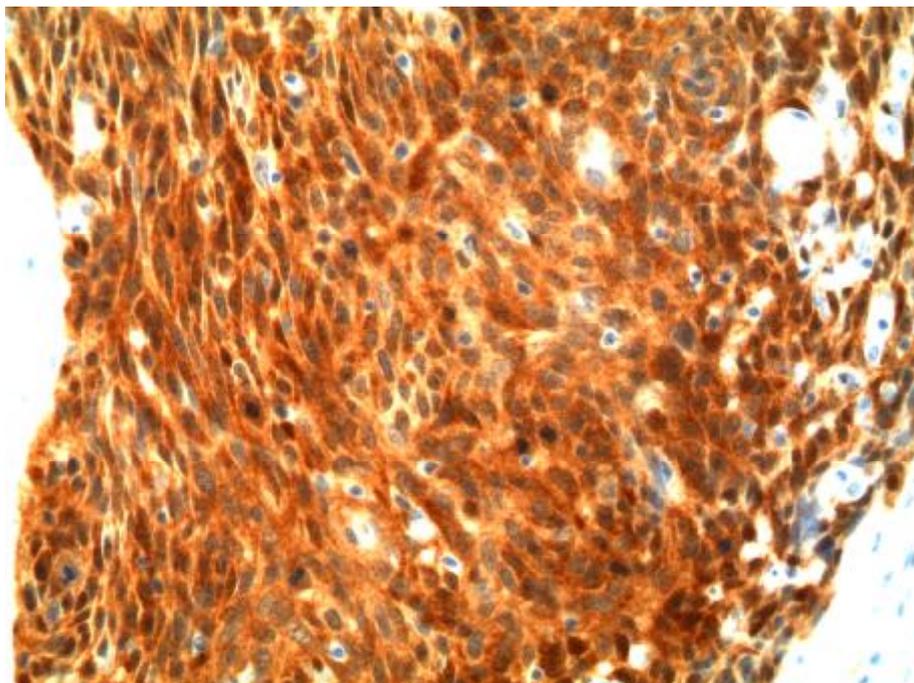
La présence de l'ADN virale doit ensuite être confirmée. Selon les laboratoires 2 principales techniques appréciées pour leur facilité pratique en routine quotidienne peuvent être employées : la PCR ou l'hybridation in situ. Dans ce dernier cas deux formes de signal sont décrites :

- la forme épisomale, correspondant à la forme extra chromosomique ou répliquative du virus, montrant un marquage diffus à l'ensemble du noyau

- la forme intégrée, correspond à la forme active du virus, intégrée au génome, dans laquelle le marquage est nucléaire punctiforme et discret.

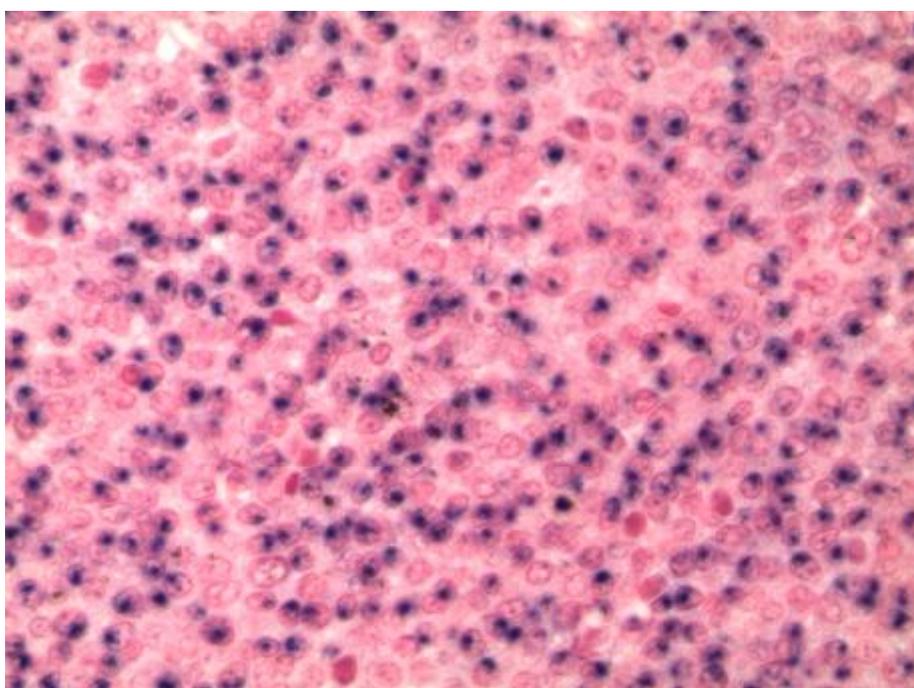
Dans notre étude, 15 patients exprimaient de façon intense et diffuse la P16. L'hybridation in situ de ces cas par la sonde HPV16/18 a révélé la présence de 6 cas positifs. 12% des patients P16+/HPV16/18+ et 9% étaient P16+/HPV16/18-.

Figure 8: Evaluation de l'expression de la p16 et HPV16/18



Immunomarquage nucléaire et cytoplasmique, diffus et intense par la p16.

(X20)



Hybridation in situ : marquage intégré nucléaire punctiforme par l'HPV16/18.

(X40)

III-3- DISCUSSION

Dans les cancers oropharyngés de stade clinique avancé (stade III et IV) le traitement fait appel à plusieurs modalités thérapeutiques. Cependant pour les patients de stade I/II (tu confonds toujours stade et grade qui sont différents le traitement est basé sur un seul protocole thérapeutique avec respectivement 25% et 37% de récurrence locorégionale pour les stades I et II.

De cette notion est découlée l'idée d'identifier et d'instaurer une thérapie adjuvante pour ces patients présentant un bas grade mais un haut risque de progression tumorale.

Jusqu'à l'heure actuelle les deux paramètres histologiques pris en compte pour le traitement des carcinomes oropharyngés sont la présence d'invasion nerveuse et la qualité des limites chirurgicales [15]. De très rares études se sont intéressées à une évaluation de plusieurs paramètres histologiques de la tumeur afin de détecter une population de mauvais pronostic.

L'EGFR est exprimé par la majorité des cancers oropharyngés. Dans notre étude 80% des tumeurs expriment l'EGFR. Ce chiffre est concordant avec la littérature [16] et suggère que toute prolifération tumorale est médiée par une expression anormale de l'EGFR. En effet, le marquage de l'EGFR est présent au niveau de la tumeur et des couches basales de l'épithélium malpighien normal qui est en perpétuelle régénération.

Le double marquage D2-40/Ki67 a permis de détecter dans 80% des cas des lymphatiques proliférants qui est un signe d'une lymphangiogenèse active. La richesse du stroma tumoral par les vaisseaux lymphatiques, avec une moyenne de 20 lymphatiques/mm² dans notre étude, augmente considérablement le risque de l'envahissement ganglionnaire.

Les patients présentant un stade précoce de la maladie sont susceptibles d'appartenir au groupe de haut risque de récurrence et des tumeurs secondaires [17]. D'où l'acharnement pour le développement de thérapies ciblées permettant un traitement à la carte des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou.

L'angiogenèse, la formation de nouveaux vaisseaux, responsable de la progression tumorale et cible prometteuse du traitement anticancéreux.

L'angiogenèse joue un rôle central dans la croissance tumorale, l'invasion et les métastases [18]. C'est un processus complexe résultant d'un déséquilibre entre les facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques. Elle s'appuie sur

une cascade de signaux biochimiques intervenant dans l'initiation et le développement vasculaire. En réponse à l'hypoxie, cellules tumorales libèrent des molécules pro-angiogéniques, y compris le VEGF et ces récepteurs, qui déclenchent la dégradation de la membrane basale par protéases et permet la migration des cellules endothéliales dans l'espace interstitiel. [18].

Ce processus est nécessaire pour la progression tumorale, si non la tumeur serait limitée à quelques millimètres.

La surexpression du VEGF et de ses récepteurs a été rapportée dans plusieurs tumeurs solides, y compris le carcinome épidermoïde de la tête et du cou, est généralement associé à une résistance à la chimiothérapie et à un mauvais pronostic [19]. La réponse clinique aux antiangiogéniques n'est efficace que chez un sous groupe limité des patients [6-20].

Dans notre étude l'expression du VEGFR-3 n'a pas été exprimée. Dans une étude précédente des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, ou la densité des micro vaisseaux pour les tumeurs classées T3/T4 a été significativement plus élevé que pour les tumeurs classées T1/T2. [21]

Depuis les 20 dernières années un large nombre d'études a démontré le rôle que jouait HPV dans le développement des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. Aujourd'hui, on estime que HPV serait responsable d'au moins 25% des carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx (estimation très variable en fonction des pays).

Des critères épidémiologiques, cliniques, histologiques et pronostiques incitent à en faire une entité particulière, à distinguer des autres carcinomes épidermoïdes HPV- de la sphère ORL.

Les carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx HPV+ apparaissent comme un groupe de tumeur distinct des carcinomes HPV-. Le facteur de risque principalement identifié dans le premier groupe est le comportement sexuel à risque. Par contraste, les cancers HPV- sont associés à la consommation alcool-tabagique et une pauvre hygiène bucco-dentaire. Par ailleurs, les carcinomes HPV+ tendent à toucher les patients jeunes (avant 60 ans), de race blanche et de sexe masculin. Ces 2 types de tumeur présentent également des profils moléculaires différents. Les carcinomes HPV+ montrent une inactivation des protéines p53 et pRB et une surexpression de la protéine p16. A contrario, les tumeurs HPV- présentent souvent une surexpression

de la p53 en relation avec des mutations de ce gène, et une inactivation de la p16. Cliniquement, ces patients se présentent également à des stades locorégionaux plus avancés et il n'est pas rare de diagnostiquer avant ou en même temps que la tumeur primitive des métastases ganglionnaires. Malgré un stade locorégional plus avancé, ces patients semblent répondre davantage au traitement par radio chimiothérapie et à a thérapie ciblée (Cetuximab). Le risque de tumeur primitive secondaire est également plus bas.

Le diagnostic des carcinomes épidermoïdes oropharyngé HPV+ n'engendre pas encore aujourd'hui de prise en charge thérapeutique particulière. Plusieurs essais thérapeutiques sont en cours et tous s'accordent à proposer des protocoles radiochimiothérapie moins agressifs que ceux employés dans les cancers ORL HPV-. Enfin des campagnes de dépistage de ces infections et des campagnes de vaccinations ont été évoquées. Cependant, contrairement aux lésions du col utérin, il n'existe pas encore de lésions précancéreuses clairement identifiées en relation avec HPV au niveau ORL. Par ailleurs, aucune méthode de dépistage de ces infections orales n'est particulièrement recommandée (brossage, rinçage).

Des publications récentes montrent que l'on retrouve des carcinomes de l'oropharynx p16+ et HPV 16/18- (environ 15% des cas) et que cette entité est de pronostic équivalent à celui des tumeurs P16+, HPV16/18+. Ces résultats suggèrent que seule la surexpression de la p16 par les cellules carcinomateuses en immunohistochimie permettrait de classer la tumeur comme étant de bon pronostic. Cependant ces données soulèvent 3 questions. Premièrement, HPV pourrait être perdu au fur et à mesure que la tumeur progresse avec conservation de la perte d'expression de pRB selon un mécanisme indépendant de l'expression de l'oncoprotéine virale E7. Deuxièmement, il existerait des voies indépendantes de HPV initiant une surexpression de la p16. Troisièmement, d'autres génotypes de virus HPV ne renfermant pas les séquences consensus habituellement utilisées dans les techniques standards de dépistages seraient également associées à la pathogénèse de ces carcinomes.

IV- CORRELATION

Nous avons essayé d'établir une corrélation entre les paramètres histologiques et les caractéristiques immunohistochimiques de la tumeur avec la présence ou l'absence de métastases ganglionnaires.

Pour tous les variables histologiques étudiées, à l'exception des marges d'exérèse chirurgicales, on a trouvé une différence significative avec un $P < 5\%$. (Tableau 3, 4).

En effet, on n'a pas retrouvé de corrélation entre l'étude des marges d'exérèse et la survenue de métastases ganglionnaires. Ce résultat concorde avec une cohorte de Brandwein et col [23] à propos de 305 patients dans laquelle ils n'ont pas trouvé de différence significative en terme de récurrences locorégionale en cas de marges négatives versus tumorales.

Dans notre étude, 73% des patients présentant des métastases ganglionnaires à l'évidement cervical avaient un front d'invasion spiculé (de type 2) alors que 90% des tumeurs présentant un front d'invasion continu (type 1) ne présentaient pas de métastase ($P=0.018$). Les trois patients présentant des îlots tumoraux à distance n'ont pas eu de métastases, cet effectif n'est pas suffisant pour retirer des conclusions. Dans l'étude de Brandwein et col [22], 25% des patients présentant un front d'invasion type 3 ont une évolution péjorative comparés au front d'invasion type 2.

Plus de la moitié des patients présentant des métastases avaient des engainement périnerveux ($P=0.008$). Rahima et coll [22] a mis en évidence dans une analyse uni variée que les engainement nerveux étaient significativement corrélé à une récurrence locale ($P=0.005$), récurrence régionale ($P=0.007$) et des métastases à distance ($P=0.013$).

73% des patients avec métastases présentent des embolies vasculaires alors que 79% des patients avec embolies vasculaires ne présentent pas de métastases ($P=0.002$).

L'invasion musculaire a été détecté chez 82% des patients avec métastases ($P=0.005$) avec un niveau d'infiltration musculaire de 3,3mm en moyenne ($P=0.008$)

Une moyenne d'épaisseur tumorale de 8.6mm ($P=0.005$) a été retrouvé dans les cas avec métastases avec une largeur tumorale de 11,5mm ($P=0.038$).

Tableau 3 : Comparaison selon le groupe métas ganglionnaires : évidence

| variable | modalité | Métas = non Nb % des col. % des lign. | Métas = oui Nb % des col. % des lign. | Test | p |
|---------------------|------------------|--|--|--------|----------|
| front d invasion | continu | 26 / 68.42% / 89.66% | 3 / 27.27% / 10.34% | Fisher | 0.018623 |
| | spiculé | 9 / 23.68% / 52.94% | 8 / 72.73% / 47.06% | | . |
| | îlots à distance | 3 / 7.89% / 100.00% | 0 / 0 % / 0 % | | . |
| invasion nerveuse | non | 33 / 86.84% / 86.84% | 5 / 45.45% / 13.16% | Fisher | 0.008844 |
| | oui | 5 / 13.16% / 45.45% | 6 / 54.55% / 54.55% | | . |
| embols vasculaires | non | 30 / 78.95% / 90.91% | 3 / 27.27% / 9.09% | Fisher | 0.002627 |
| | oui | 8 / 21.05% / 50.00% | 8 / 72.73% / 50.00% | | . |
| invasion musculaire | non | 25 / 65.79% / 92.59% | 2 / 18.18% / 7.41% | Chi2 | 0.005181 |
| | oui | 13 / 34.21% / 59.09% | 9 / 81.82% / 40.91% | | . |
| marge d'exérèse | <5mm | 4 / 10.53% / 66.67% | 2 / 18.18% / 33.33% | Fisher | 0.656511 |
| | >5mm | 31 / 81.58% / 77.50% | 9 / 81.82% / 22.50% | | . |
| | tumorale | 3 / 7.89% / 100.00% | 0 / 0 % / 0 % | | . |

Tableau 4 : Comparaison selon le groupe métas ganglionnaires : évidence

| variable | PN | n | Moyenne | Test | p |
|-----------------------------------|-----|----|---------|------------|-------|
| niveau d invasion musculaire (mm) | non | 38 | 0,650 | WMW rk sum | 0.008 |
| | oui | 12 | 3,267 | | . |
| épaisseur tumorale (mm) | non | 38 | 4,572 | WMW rk sum | 0.005 |
| | oui | 11 | 8,659 | | . |
| largeur tumorale (mm) | non | 38 | 8,331 | WMW rk sum | 0.038 |

L'étude immunohistochimique avec l'EGFR, P16+/HPV16/18+, P16+/HPV16/18- et le double marquage D2-40/KI67 n'était pas corrélée à la présence ou l'absence de métastases ganglionnaires de l'évidement cervical ou du ganglion sentinelle.

V- CONCLUSION

La technique du ganglion sentinelle fait maintenant partie intégrante de l'arsenal thérapeutique du chirurgien ORL. Elle s'adresse tout particulièrement aux lésions de petite taille de la cavité buccale et de l'oropharynx. Elle trouve tout son intérêt dans la prise en charge des lésions classées cT1T2N0, dans la mesure où les tumeurs primitives restent accessibles à une injection péri-tumorale de traceur isotopique.

Il a été démontré que le staging ganglionnaire obtenu pN(sn) doit prévaloir sur le statut pN. Il est, en effet, plus précis et génère souvent un upgrading diagnostique. A la lumière, de ces données et en considérant l'existence de récurrences cervicales, certes rares mais très péjoratives, chez les patients pN+(sn), il s'agit d'un critère pronostique important. Les traitements adjuvants proposés aux patients devront prendre en compte ces nouvelles données.

Cette étude a permis de mettre en évidence des paramètres histologiques définissant chez ces patients avec un stade clinique faible un sous type de haut risque de progression tumorale. La taille tumorale moyenne de 8mm, le front d'invasion spiculé, les engainnements nerveux, les embolies vasculaires et l'invasion musculaire sont des critères histologiques de mauvais pronostic, pouvant justifier une thérapeutique plus agressive avec radiothérapie complémentaire

VI- RESUME:

Les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou sont une cause de mortalité et de morbidité majeure avec 500 000 nouveaux cas par an.

Leur carcinogénèse est un processus multi étape faisant intervenir plusieurs événements génétiques altérant le fonctionnement normal des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs.

Durant ces dernières années, une attention particulière a été consacrée à l'étude de l'angiogénèse tumorale qui joue un rôle crucial dans la croissance, la prolifération et l'invasion tumorale, et qui fait partie des thèmes majeurs de la recherche en oncologie en vue de développement de nouveaux marqueurs pronostiques, et de s'engager sur de nouvelles stratégies thérapeutiques anti tumorales visant à inhiber les processus de cette angiogénèse.

Aussi, le pronostic des cancers ORL est lié essentiellement aux métastases ganglionnaires évaluées à partir de l'examen histologique des évidements cervicaux qui restent jusqu'à présent le garant d'un diagnostic exhaustif ainsi que d'une prise en charge thérapeutique optimale. L'examen anatomo-pathologique est parfois mis en défaut par manque de sensibilité pour diagnostiquer certaines métastases ganglionnaires. Par ailleurs, l'évidement cervical fonctionnel complet est pourvoyeur d'une morbidité non négligeable,

La prise en charge des cancers ORL est un véritable challenge entre d'une part la volonté de réduire les séquelles post-opératoires et d'autre part la nécessité de garantir une prise en charge optimale aux patients d'où l'idée de développer la technique du ganglion sentinelle dans les cancers ORL cliniquement N0 sur le modèle chirurgical du cancer mammaire.

Notre travail a porté sur une étude rétrospective de 50 patients colligés au sein du service d'anatomie pathologique du CHU de Montpellier entre 2002 et 2008.

Tous les patients présentaient un carcinome épidermoïde de la cavité orale ou de l'oropharynx cliniquement cNOMO, à la prise en charge et n'avaient jamais reçu de traitement carcinologique antérieur. Il s'agissait systématiquement de lésions classées cT1-T2 et ayant fait l'objet d'une injection péri-tumorale de traceur isotopique pour détecter les ganglions sentinelles. Ces patients ont bénéficié d'un curage classique dans lequel le ou les ganglion(s) sentinelle(s) ont été repérés et traités selon la technique recommandée.

Le but de ce travail est double. Nous allons comparer les résultats de l'histologie standard après simple coloration à l'hématéine éosine des ganglions sentinelles repérés après scintigraphie aux résultats obtenus après immunohistochimie avec un anticorps anti pan-cytokératine, réalisée sur coupes sériées tous les 200 microns jusqu'à épuisement du bloc.

Secondairement nous allons évaluer par étude immunohistochimique des facteurs intervenant dans la prolifération et l'invasion tumorale à savoir l'expression de l'EGFR, du VEGF (vascular endothelial growth factor), et de D2-40/ki67 (pour évaluer la prolifération lymphatique). Nous établirons également le statut HPV de ces tumeurs (P16 et hybridation avec les sondes HPV16/18).

Nous chercherons d'éventuelles corrélations entre ces différents marqueurs tissulaires et la présence de métastases ganglionnaires.

Références

1. Guerrier B, Guerrier Y. [Functional emptying of the neck. Technic, indications, results]. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 1976;30(5):512-532.
2. Guerrier Y, Guerrier B. [Cervical biopsy: exploration of the neck and lymph gland biopsy]. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord).* 1978;99(5-6):299-306.
3. Schmitz S, Machiels J, Weynand B, Gregoire V, Hamoir M. Results of selective neck dissection in the primary management of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2009;266(3):437-443.
4. Kuntz AL, Weymuller EA. Impact of neck dissection on quality of life. *Laryngoscope.* 1999;109(8):1334-1338.
5. Atula T, Hunter KD, Cooper LA, et al. Micrometastases and isolated tumour cells in sentinel lymph nodes in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 2009;35(5):532-538.
6. Savvides P, Greskovich J, Bokar J, et al. Phase II study of bevacizumab in combination with docetaxel and radiation in locally advanced squamous cell cancer of the head and neck (SCCHN). *Abstracts of the 2007 Multidisciplinary Head and Neck Cancer Symposium 2007:1.*
7. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signaling and therapeutic inhibition. *Cell Signal* 2007;19:2003–2012.
8. Crean S, Hoffman A, Potts J, Fardy MJ. Reduction of occult metastatic disease by extension of the supraomohyoid neck dissection to include level IV. *Head Neck.* 2003;25(9):758-762.

9. Iype EM, Sebastian P, Mathew A, et al. The role of selective neck dissection (I-III) in the treatment of node negative (N0) neck in oral cancer. *Oral Oncol.* 2008;44(12):1134-1138.
10. Kovács AF, Stefenelli U, Seitz O, et al. Positive sentinel lymph nodes are a negative prognostic factor for survival in T1-2 oral/oropharyngeal cancer-a long-term study on 103 patients. *Ann. Surg. Oncol.* 2009;16(2):233-239.
11. Tschopp L, Nuyens M, Stauffer E, Krause T, Zbären P. The value of frozen section analysis of the sentinel lymph node in clinically N0 squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005;132(1):99-102.
12. Gérard ZALCMAN Voie de l'EGFR et mécanisme d'action des inhibiteurs de tyrosine kinase *Revue de pneumologie clinique.* Vol 63, N 1-C2, 2007
13. Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2008;359:1143–1154.
14. Apostolos Christopoulos et al *Biology of vascular endothelial growth factor and its receptors in head and neck cancer: beyond angiogenesis* Wiley Periodicals, Inc. *Head Neck* 00: 000–000, 2010
15. Brandwein-Gensler M, Smith RV, Wang B, Penner C, Theilken A, Broughel D, Schiff B, and al Validation of the histologic risk model in a new cohort of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2010 May;34(5):676-88.
16. Sarkis SA, Abdullah BH, Abdul Majeed BA, Talabani NG Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in oral squamous cell carcinoma in relation to proliferation, apoptosis, angiogenesis and lymphangiogenesis. *Head Neck Oncol.* 2010 Jun 25;2:13.

17. Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2008;359:1143–1154.
18. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;23:1011–1027.
19. Riedel F, Gotte K, Schwalb J, Wirtz H, Bergler W, Hormann K. Serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2000;257:332–336.
20. Vokes EE, Cohen EE, Mauer AM, et al. A phase I study of erlotinib and bevacizumab for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (HNC). *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2005;23:5504
21. Lentsch EJ, Goudy S, Sosnowski J, Major S, Bumpous JM. Microvessel density in head and neck squamous cell carcinoma primary tumors and its correlation with clinical staging parameters. *Laryngoscope* 2006;116:397–400.
22. Rahima B, Shingaki S, Nagata M, et al. Prognostic significance of perineural invasion in oral and oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97:423–431.